

## 明 細 書

## 樹状細胞浸潤能活性化組成物及び免疫賦活剤

## 5 技術分野

本発明は、樹状細胞の浸潤能を活性化するための組成物、免疫賦活剤等に関する。

## 背景技術

これまでの腫瘍免疫療法では、インターロイキン-2（IL-2）等を投与する  
10 免疫賦活療法や、患者の末梢リンパ球から誘導されたリンホカイン活性化キラー細胞（LAK）や腫瘍内浸潤リンパ球（TIL）を輸注する養子免疫療法、抗腫瘍抗原モノクローナル抗体を用いたミサイル療法等、種々の免疫療法が試みられている。

また、癌に対する遺伝子治療も盛んに行われており、特に、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）等のサイトカイン遺伝子を導入した癌細胞を  
15 移植して、癌に対する免疫を誘導し、癌を治療する細胞ワクチン療法が注目されている。一方、樹状細胞は代表的な抗原提示細胞として知られている。樹状細胞は造血幹細胞由来の樹枝状形態をとる細胞集団であり、生体内に広く分布している。ヘルパーT細胞の活性化は、樹状細胞による抗原提示に依存しており、樹状細胞は、末梢血液中の抗原をとらえ、リンパ節に移動し、最終的にリンパ節で成熟すると考  
20 えられる。

一般に、未成熟樹状細胞は、抗原となる異物を取り込み、その抗原を消化する能力が高いが、抗原提示能は低い。これに対し、成熟樹状細胞は、抗原の取り込み能が低い  
25 が、抗原提示能が高いということが知られている。生体内においては、未成熟樹状細胞が異物を取り込み、細胞内においてその異物を消化し、その刺激によって分化した成熟樹状細胞は、消化した異物の一部を細胞外に提示して、リンパ球に特定の抗原情報を伝えると考えられている。

生体内において、樹状細胞は骨髄の造血幹細胞から誘導されることが知られている。樹状細胞の前駆細胞及び未成熟樹状細胞は、血液及びリンパ球中に存在してお

り、成熟樹状細胞は脾臓及びリンパ節に存在している。末梢組織の単核が顆粒球コロニー刺激因子（GM-CSF）、インターロイキン-4（IL-4）で刺激されると、未成熟樹状細胞へ分化することが知られており、更に未成熟樹状細胞を腫瘍壊死因子（TNF）で刺激すると成熟樹状細胞へと分化することが知られている。

- 5 異物が生体内に侵入した場合、樹状細胞が異物を貪食し、抗原をT細胞に提示する機能を有しており、抗原を提示されたT細胞が抗原を貪食する。このような機能を発揮するために、樹状細胞は、生体内に異物が侵入した時に、末梢組織から所属リンパ節まで移動し、異物が侵入したことを提示している。

- 一般に、癌患者の癌細胞中の酸素濃度は正常細胞に比較して20%程度に低下していることが知られている。このような低酸素状態で分化した樹状細胞は、細胞外マトリックスタンパク質を溶解するマトリックスメタロプロテイナーゼ-9（MMP-9）の産生が低下している。生体内においては、樹状細胞が末梢組織を移動する時や、血管やリンパ管を通り抜ける時にも、このマトリックスメタロプロテイナーゼ-9が必要であることが知られている。

- 15 従って、低酸素状態で分化した樹状細胞は末梢組織からリンパ節に移動することができず、上述したような抗原提示能を発揮することができなくなる。このため、癌細胞内では樹状細胞の抗原提示能が発揮されないため、T細胞が癌細胞を死滅することができない。

- 従って、本発明の目的は、癌細胞等の酸素濃度の低い状態で産生された樹状細胞  
20 がリンパ節まで移動することを可能にする、すなわち樹状細胞浸潤能を活性化  
組成物を提供することにある。また、本発明の目的は、免疫賦活剤を提供することにある。

#### 発明の開示

- 25 本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意検討した結果、レチノイドが樹状細胞の浸潤能を活性化することを見出し、本発明を完成させた。

本発明は上記知見に基づいてなされたものであり、レチノイドを含有する、樹状細胞浸潤能活性化組成物を提供するものである。

また、本発明は、哺乳動物に対して、レチノイドを投与することを特徴とする、樹状細胞の浸潤能を活性化する方法を提供するものである。

また、本発明は、哺乳動物に対して、上記樹状細胞浸潤能活性化組成物を投与することを特徴とする、樹状細胞の浸潤能を活性化する方法を提供するものである。

5      また、本発明は、レチノイドを含有する、免疫賦活剤を提供するものである。

また、本発明は、レチノイド及び樹状細胞を含有する、免疫賦活剤を提供するものである。

また、本発明は哺乳動物細胞に対して、レチノイドを投与することを特徴とする、哺乳動物の免疫を賦活化する方法を提供するものである。

10      また、本発明は哺乳動物に対して、上記免疫賦活剤を投与することを特徴とする、哺乳動物の免疫を賦活化する方法を提供するものである。

また、本発明は上記樹状細胞浸潤能活性化組成物、又は上記免疫賦活剤を、投与又は使用することを特徴とする、動物の感染症、癌の予防・治療方法を提供するものである。

15

#### 図面の簡単な説明

図 1 はフローサイトメーターによる表面抗原解析の結果を示す図である。

図 2 は、リアルタイム P C R の結果を示す図である。

図 3 は、ウェスタンブロット解析の結果である。

20      図 4 は、ゼラチンザイモグラフィー法の結果である。

図 5 は、ゼラチンザイモグラフィー法の結果である。

図 6 は、リアルタイム P C R の結果を示す図である。

図 7 は未成熟樹状細胞及び成熟樹状細胞の浸潤能の活性を測定した結果を示すグラフである。

25      図 8 は、T I M P - 1 タンパク質による樹状細胞の浸潤能活性の変化を調べた結果を示すグラフである。

図 9 は、分化誘導後、細胞中の M M P - 9 の m R N A 濃度を測定した結果を示すグラフである。

図 10 は、低酸素下で分化した樹状細胞の浸潤能活性を測定した結果である

発明を実施するための最良の形態

以下、先ず本発明の樹状細胞浸潤能活性化組成物について説明する。

- 5 本発明の樹状細胞浸潤能活性化組成物はレチノイドを含有する。本発明の樹状細胞浸潤能活性化組成物に用いられるレチノイドとしては、例えばレチノイン酸、レチナール、レチノールおよび脂肪酸レチニルエステル、ならびにデヒドロレチノール、デヒドロレチノール、脂肪酸デヒドロレチニルエステル等が挙げられる。

- 10 上記レチノイン酸としては、以下のレチノイン酸の異性体、すなわち全トランスレチノイン酸、13-シスレチノイン酸、11-シスレチノイン酸、9-シスレチノイン酸、3,4-デヒドロレチノイン酸等が挙げられる。

- また、レチノールとしては、以下のレチノールの異性体、すなわち全トランスレチノール、13-シスレチノール、11-シスレチノール、9-シスレチノール、3,4-デヒドロレチノール等が挙げられる。広く市販されているため、全トランスレチノール、13-シスレチノール、全トランスレチノイン酸及び13-シスレチノイン酸が好適である。
- 15

- 本発明の樹状細胞浸潤能活性化組成物中のレチノイドの含有量は、必要な患者に投与した際に、樹状細胞浸潤能を活性化するための量であると定義される。患者に投与すべき投与量は、一般に、患者の体表面積、体重、病状等に基づいて決定される。本発明の樹状細胞浸潤能活性化組成物の投与量は、レチノイドの量として、約
- 20  $20\text{ mg/m}^2 \sim 50\text{ mg/m}^2$  程度である。なお、投与量は、投与方法、賦形剤の量、他の薬剤を併用する場合には変えることが好ましい。

- 本発明の樹状細胞浸潤能活性化組成物は、皮下、腹膜腔内、筋肉内、静脈等の非経口的に投与することができる。非経口投与製剤の形態の例として、例えば等張塩
- 25 溶液中に、5%程度の濃度のグルコース又は他の公知の医薬的に使用可能な賦形剤と、活性剤を含む水溶液が挙げられる。シクロデキストリン等の可溶化剤や当業者に公知の他の可溶剤を賦形剤として添加してもよい。

次に、本発明の免疫賦活剤について説明する。

本発明の免疫賦活剤は、レチノイドを含有する。本発明の免疫賦活剤に用いられるレチノイドとしては、上述した樹状細胞浸潤能活性化組成物に用いられるものが使用可能である。

また、免疫賦活剤中のレチノイドの含有量、投与量、投与形態等についても、上述した樹状細胞浸潤能活性化組成物と同様である。

本発明の樹状細胞浸潤能活性化組成物及び免疫賦活剤は、樹状細胞の浸潤に必要なタンパク質であるMMP-9の産生を促進することにより、樹状細胞の浸潤能を活性化する作用を有する。樹状細胞の浸潤能が活性化され、樹状細胞がリンパ節までの移動が活性化され免疫賦活作用を発揮する。このような作用を有するため、本発明の樹状細胞浸潤能活性化組成物及び免疫賦活剤は、哺乳動物（例えば、マウス、ネコ、イヌ、牛、馬、羊、山羊、家兎、ヒト等）に対して用いられる。各種白血病、悪性リンパ腫、膀胱癌、肝癌、肺癌、胃癌、大腸癌、骨肉腫、悪性黒色腫、悪性繊維上皮、筋肉腫、卵巣癌、子宮癌、前立腺癌、食道癌、頸頭部腫瘍、脳腫瘍等の各種の癌、及び各種ウイルス、細菌等による感染症等の治療及び予防に対して用いることができる。

本発明の免疫賦活剤は、更に樹状細胞を含有していてもよい。

樹状細胞は、樹状細胞の前駆細胞である単核細胞を培養することによって得ることができる。樹状細胞の前駆細胞である単核細胞の原料としては、例えば末梢血、骨髓液、臍帯血等が使用可能である。本発明の免疫賦活剤に用いられる樹状細胞は、成熟樹状細胞であっても未成熟樹状細胞であってもよい。例えば、単核細胞をGM-CSF、IL-4及びTNF- $\alpha$ で刺激して培養することにより、成熟細胞へと分化誘導することができる。

本発明の免疫賦活剤に用いられる樹状細胞は、上記単核細胞を、分化誘導剤の存在下で培養することにより得ることができる。樹状細胞の原料として、例えば末梢血の単核細胞を用いる。樹状細胞の前駆細胞である単核細胞を、採血等により採取し、採取した血液より分離精製することができる。単核細胞を赤血球から分離する方法としては、特に制限はなく、従来公知の方法が用いられる。

例えば、末梢血単核細胞をフィコールパック（Ficoll-Paql）密度勾配又は溶

出を利用する方法が一般的に用いられる。また、その他に血液細胞を、成人の赤血球を選択的に溶解する溶液、例えばアンモニウムクロライド-カリウム、アンモニウムオキサレート等に懸濁し、分離することができる。

樹状細胞の分化誘導の培養には、RPMI-1640 培地、ダルベッコ改変イー  
5 グル培地 (DMEM)、イスコフ培地 (IDDM) 等、適当な市販されている培地を用いることができる。培地中には血清を加えてもよく、例えば、5-20%程度の牛血清、牛胎児血清、もしくはヒト血清などが使用しうる。無血清で培養してもよいが、必要に応じ牛アルブミン (BSA)、ヒトアルブミン (HSA) などを添加してもよい。また、培地には、必要に応じ適当な抗生物質、抗体、ピルビン酸 (0.1 ~  
10 5 mM程度)、グルタミン (0.5 ~ 5 mM程度)、2-メルカプトエタノール (10 ~ 100  $\mu$ M程度)を含んでいてもよい。これらの培地に分化誘導剤を添加し、約37℃、約5%炭酸ガス雰囲気下で5日~21日程度培養する。培養日数は7日~14日程度が好ましい。培養温度 (34 ~ 38℃)、ガスの混合比 (炭酸ガス2 ~ 10%、さらには窒素ガス、もしくは酸素ガスを適宜混合しうる。)は、適切な条件  
15 を設定し行うことができる。

樹状細胞の前駆細胞を含む細胞群から樹状細胞へ分化誘導するには、適切な誘導剤を使用する必要がある。誘導剤としては、サイトカイン類を用いることができる。サイトカインとして、適当なものを使用すれば良いが、例えば GM-CSF、IL-4、ステムセルファクター (SCF)、インターロイキン-13 (IL-13)、TNF- $\alpha$ 、  
20 Flt3-Ligand 等が使用可能である。上記サイトカインの濃度は、培地中、好ましくは1 ~ 1000 ng/ml 程度である。

培養に用いられるサイトカインは、マウスなどの異種動物由来の因子も使用可能であるが、ヒト由来の因子を用いることが好ましい。

本発明の免疫賦活剤に用いる樹状細胞は、ヒト体内に接種して用いられるものであるため、細胞増殖性をなくしておくことより安全である。単核細胞は、分化誘導することにより増殖能が低下することが知られているが、より安全に利用するために加熱処理、放射線処理又はマイトマイシンCで処理しておくことが好ましい。

例えば、X線照射をする場合、X線照射器の管球の下に樹状細胞を含む容器を置

き、総放射線量1000～3300Rad程度で照射することが好ましい。マイトマイシンCで処理する場合、例えば、樹状細胞を $1 \sim 3 \times 10^7$ 細胞/mlの密度で懸濁して細胞浮遊液を得、この細胞浮遊液1ml当たりマイトマイシンCを25～50 $\mu$ gの比で添加して、37℃の温度で30～60分程度保温する。また、加熱

5 処理方法は、例えば樹状細胞を $1 \times 10^7$ 細胞/ml程度に懸濁して細胞浮遊液を得、この細胞浮遊液を50～65℃の温度で20分程度加熱処理を行う。

上述した、本発明の、樹状細胞を含有する免疫賦活剤は、レチノールによって樹状細胞の浸潤能が活性化され、免疫賦活作用が発揮される。従って、上記免疫賦活剤は哺乳動物（例えば、マウス、ネコ、イヌ、牛、馬、羊、山羊、家兎、ヒト等）

10 の各種白血病、悪性リンパ腫、脾癌、肝癌、肺癌、胃癌、大腸癌、骨肉腫、悪性黒色腫、悪性纖毛上皮、筋肉腫、卵巣癌、子宮癌、前立腺癌、食道癌、頸頭部腫瘍、脳腫瘍等の各種の癌、及び各種ウイルス、細菌等による感染症等に対して用いられる。樹状細胞を含有する免疫賦活剤の投与量は、患者の年齢、体重、性別、癌の種類及び癌の進行度、症状等によって異なり、一概には決定できないが、例えば投与

15 は週に一度、患者一人あたり、樹状細胞が $1 \times 10^7$ 細胞となるような量を、10週間にわたって投与する方法が挙げられる。

次に、本発明の樹状細胞の浸潤能を活性化する方法について説明する。

本発明の樹状細胞の浸潤能を活性化する方法は、哺乳動物に対して、レチノイドを投与することを特徴とする。本発明の樹状細胞の浸潤能を活性化する方法において用いられるレチノイドとしては、例えばレチノイン酸、レチナール、レチノール

20 および脂肪酸レチニルエステル、ならびにデヒドロレチノール、デヒドロレチノール、脂肪酸デヒドロレチニルエステル等が挙げられる。

上記レチノイン酸としては、以下のレチノイン酸の異性体、すなわち全トランスレチノイン酸、13-シスレチノイン酸、11-シスレチノイン酸、9-シスレチ

25 ノイン酸、3, 4-デヒドロレチノイン酸等が挙げられる。

また、レチノールとしては、以下のレチノールの異性体、すなわち全トランスレチノール、13-シスレチノール、11-シスレチノール、9-シスレチノール、3, 4-デヒドロレチノール等が挙げられる。広く市販されているため、全トラ

ンスレチノール、13-シスレチノール、全トランスレチノイン酸及び13-シスレチノイン酸が好適である。

本発明の樹状細胞の浸潤能を活性化する方法に用いられるレチノイドとしては、上述した本発明の樹状細胞浸潤能活性化組成物を用いることができる。

- 5 本発明の樹状細胞の浸潤能を活性化する方法が適用される哺乳動物としては、例えばマウス、ネコ、イヌ、牛、馬、羊、山羊、家兎、ヒト等が挙げられる。本発明の樹状細胞の浸潤能を活性化する方法において用いられるレチノイドの量としては、必要な患者に投与した際に、樹状細胞浸潤能を活性化するための量であると定義される。患者に投与すべき投与量は、一般に、患者の体表面積、体重、病状等に基づいて決定される。本発明の樹状細胞浸潤能活性化組成物の投与量は、レチノイドの
- 10 量として、約20mg/m<sup>2</sup>～約50mg/m<sup>2</sup>程度である。なお、投与量は、投与方法、賦形剤の量、他の薬剤を併用する場合には変えることが好ましい。投与方法としては、皮下、腹腔内、筋肉内、静脈等の非経口的な投与が好ましい。

- 本発明の樹状細胞の浸潤能を活性化する方法によれば、樹状細胞の浸潤に必要な
- 15 タンパク質であるMMP-9の産生が促進され、樹状細胞の浸潤能が活性化され、樹状細胞のリンパ節への移動が活性化されることにより、免疫賦活作用を発揮する。従って、本発明の樹状細胞の浸潤能を活性化する方法は、上記哺乳動物に対して用いることができ、各種白血病、悪性リンパ腫、膀胱癌、肝癌、肺癌、胃癌、大腸癌、骨肉腫、悪性黒色腫、悪性繊維上皮、筋肉腫、卵巣癌、子宮癌、前立腺癌、食道癌、
- 20 頸頭部腫瘍、脳腫瘍等の各種の癌、及び各種ウイルス、細菌等による感染症等の治療及び予防に対して用いることができる。すなわち、本発明によれば、本発明の樹状細胞浸潤能活性化組成物を投与又は使用することを特徴とする、動物の感染症、癌の予防・治療方法が提供される。

次に、本発明の免疫を賦活化する方法について説明する。

- 25 本発明の免疫を賦活化する方法は、哺乳動物に対して、レチノイドを投与することを特徴とする。本発明の免疫を賦活化する方法において用いられるレチノイドとしては、例えばレチノイン酸、レチナール、レチノールおよび脂肪酸レチニルエステル、ならびにデヒドロレチノール、デヒドロレチノール、脂肪酸デヒドロレ



チニルエステル等が挙げられる。

上記レチノイン酸としては、以下のレチノイン酸の異性体、すなわち全トランスレチノイン酸、13-シスレチノイン酸、11-シスレチノイン酸、9-シスレチノイン酸、3, 4-デヒドロレチノイン酸等が挙げられる。

- 5     また、レチノールとしては、以下のレチノールの異性体、すなわち全トランスレチノール、13-シスレチノール、11-シスレチノール、9-シスレチノール、3, 4-デヒドロレチノール等が挙げられる。広く市販されているため、全トランスレチノール、13-シスレチノール、全トランスレチノイン酸及び13-シスレチノイン酸が好適である。

- 10    本発明の免疫を賦活化する方法に用いられるレチノイドとしては、上述した本発明の免疫賦活剤を用いることができる。

本発明の免疫を賦活化する方法が適用される哺乳動物としては、上述した、本発明の樹状細胞浸潤能活性化方法が適用される哺乳動物が挙げられる。また、使用されるレチノイドの量、投与方法などについても、上述した、樹状細胞浸潤能活性化

- 15    方法と同様である。

本発明の免疫を賦活化する方法によれば、樹状細胞の浸潤に必要なタンパク質であるMMP-9の産生が促進され、樹状細胞の浸潤能が活性化され、樹状細胞のリンパ節への移動が活性化されることにより、免疫賦活作用を発揮する。従って、本発明の免疫を賦活化する方法は、上記哺乳動物に対して用いることができ、各種白

20    血病、悪性リンパ腫、膀胱癌、肝癌、肺癌、胃癌、大腸癌、骨肉腫、悪性黒色腫、悪性繊毛上皮、筋肉腫、卵巣癌、子宮癌、前立腺癌、食道癌、頸頭部腫瘍、脳腫瘍等の各種の癌、及び各種ウイルス、細菌等による感染症等の治療及び予防に対して用いることができる。すなわち、本発明によれば、本発明の免疫賦活剤を投与又は使用することを特徴とする、動物の感染症、癌の予防・治療方法が提供される。

25

#### 実施例

以下に、実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

### 実施例 1

健康者由来の末梢単核細胞（PBMC）をフィコールパック密度交配遠心分離により分離した。末梢単核細胞を、完全RPMI-1640培地中に、 $2 \times 10^6$ 細胞/mlになるように分散させ、37℃で1時間インキュベートすることにより付着性細胞を得た。非付着性細胞は、RPMI-1640培地で5回洗浄して除去した。付着性細胞を、1000U/mlのGM-CSF及び1000U/mlのIL-4、10%FBS、25mM HEPES、2mM L-グルタミン酸、50μM 2-ME、1%非必須アミノ酸及び2mMピルビン酸ナトリウムを含むRPMI培地中で、低酸素状態（1%酸素濃度、以下本明細書において、低酸素状態とは、1%酸素濃度状態をいう）及び正常酸素状態（20%酸素濃度、以下本明細書において、正常酸素状態とは、20%酸素濃度状態をいう）で、毎日、培地を半分交換しながら37℃、5%炭酸ガス雰囲気下で6日間培養した。6日目に、細胞を集め、2つのグループに分けた。1つ目のグループはIL-4及びGM-CSFを含む培地で1日培養し、未成熟樹状細胞として用いた。2つ目のグループはLPS（1μg/ml）で1日処理し、成熟樹状細胞として用いた。

### 実施例 2

実施例 1 で得られた樹状細胞の表面抗原の検出をフローサイトメーターを用いて行った。抗原の検出は未成熟細胞及び成熟細胞について行った。測定する細胞（ $5 \times 10^5$ 個）を、CD83、CD80、CD14、HLA-ABC、HLA-DRに対する、FITC結合マウスモノクローナル抗体、及びヒトCD1a及びCD86に対するマウスモノクローナル抗体と4℃で30分インキュベートした。用いたモノクローナル抗体はImmunotech社から購入した。次いで、細胞を生理食塩加リン酸緩衝液（PBS、pH7.0）で2回洗浄して過剰のモノクローナル抗体を除去した。次いで、フルオレセイン結合抗マウスIgG+IgM(H+L)山羊抗体（Jackson ImmunoResearch Laboratories 社製）と45分間インキュベートし、フローサイトメーターを用いて解析を行った。結果を図1に示す。図1はフローサイトメーターによる表面抗原解析の結果を示す図であり、図1においてi m D C s は未成熟樹状細胞

胞を示し、mD C s は成熟樹状細胞を示す。

図 1 に示すように、単球細胞のマーカーである C D 1 4 は未成熟樹状細胞及び成熟樹状細胞に発現されていなかった。樹状細胞マーカーである C D 8 3 は、未成熟樹状細胞及び成熟樹状細胞に発現していた。共刺激性分子、C D 8 0 及び C D 8 6  
5 は、未成熟樹状細胞及び成熟樹状細胞に発現していた。H L A - D R、H L A - A B C 及び C D 1 a は、未成熟樹状細胞及び成熟樹状細胞に発現していた。これらの結果は、I L - 4 及び G M - C S F の存在下で正常酸素状態及び低酸素状態で分化した細胞は未成熟樹状細胞 ( i m D C s ) であると判断され、正常酸素状態及び低酸素状態で分化した L P S で処理された細胞は成熟樹状細胞 ( m D C s ) であると  
10 判断される。

### 実施例 3

実施例 1 で得られた未成熟樹状細胞及び成熟樹状細胞を、低酸素状態及び正常酸素状態で分化し、それぞれの細胞中の M M P - 9 の m R N A の発現をリアルタイム  
15 P C R 法により調べた。なお、低酸素状態及び正常酸素状態での分化は、それぞれ 1 % 酸素濃度、2 0 % 酸素濃度において、培養チャンバーを用いて 7 日間行った。リアルタイム P C R は以下のように行った。細胞は、3 名のドナー由来の未成熟樹状細胞及び成熟樹状細胞を用いた。培養して得られた細胞 (  $1 \times 10^6$  細胞 ) からトリゾル試薬 ( TRIZOL reagent、LIFE TECHNOLOGIES 社 ) を用いて全 R N A を分離した。  
20 7 5 m M K C l、5 0 m M T r i s - H C l ( p H 8 . 3 )、3 m M M g C l 2、1 0 m M ジチオスレイトール、0 . 5 m M の各 d N T P、2  $\mu$  M ランダムプライマー、及び 1 0 0 0 U の TaqMan Reverse 転写試薬を含む 5 0  $\mu$  l の反応混合物中で各 R N A 試料 ( 2  $\mu$  g ) を c D N A に変換した。各 c D N A ( 1 0 n g ) を SYBR-Green PCR assay kit を用いて 3 組増幅し、ABI PRISM 7900HT sequence Detection  
25 System で配列を決定した。P C R 反応は、5 0 ° C で 2 分、9 5 ° C で 1 5 分インキュベートし、次いで 9 5 ° C での 1 5 サイクルの変性、6 0 ° C での 3 0 サイクルのアニールリング、及び 7 2 ° C での 1 分間の伸長を行った。プライマーとして配列番号 1 及び配列番号 2 に示すものを用いた。

結果を図2に示す。図2は、リアルタイムPCRの結果を示す図である。図2において、i m D C s は未成熟樹状細胞を示し、m D C s は成熟樹状細胞を示し、Nは正常酸素状態、Hは低酸素状態を示す。図2に示すように、正常酸素状態下で分化した未成熟樹状細胞及び成熟細胞は、低酸素状態で分化したものよりも2～5倍高いレベルでMMP-9のmRNAを発現した。

#### 実施例4

実施例1で得られた未成熟樹状細胞及び成熟樹状細胞を、 $5 \times 10^5$ 細胞/mlになるように、血清を含まないRPMI 1640培地で希釈し、37℃の温度で低酸素状態及び正常酸素状態で24時間培養を行った。培地を遠心分離して上清を集め、-70℃に保存した。MMP-9タンパク質の生産量を定量するため、同量のタンパク質濃度の樹状細胞の培養上清を7.5w/vのポリアクリルアミドゲル上にロードし、SDS-PAGEを行った。ヒト繊維肉腫細胞株HT1080の培地を、ポジティブコントロールとして用いた( $\beta$ -アクチンを生産する)。SDS-PAGEの後、タンパク質をニトロセルロース膜(Bio-Rad、Hercules、CA)上にセミドライ法によりブロッティングした。通常のプロッキング及び洗浄を行った後、その膜を濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ のヒトMMP-9に対する一次抗体を用いて、室温で1時間インキュベートした。用いた一次抗体は、ヒトMMP-9に対して生じるマウスポリクローナルIgGであり、二次抗体は1:2000の希釈率でホースラディッシュ・ペルオキシダーゼにより標識されたウサギanti-mouse IgG(H&L)である。細胞内のMMP-9プロテインを検出するために、 $15 \mu\text{g}$ のタンパク質を含むそれぞれの細胞溶解物をロードし、ウェスタンブロット解析を行った。膜はペルオキシダーゼで標識されたヤギ anti-mouse IgGを用いてインキュベートし、ECL検出キット(Amersham、東京、日本)を用いて現像した。

結果を図3に示す。図3は、ウェスタンブロット解析の結果であり、図3に示すように、正常酸素状態下で分化した未成熟樹状細胞及び成熟樹状細胞は、低酸素状態で分化したものよりも、高いレベルでMMP-9タンパク質を産生していた。

### 実施例 5

実施例 4 で培養した、未成熟樹状細胞及び成熟樹状細胞について、ゼラチンザイモグラフィ法を実施した。その方法を以下に説明する。

- 5     ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 及びゼラチンを含有するポリアクリルアミドゲル中での電気泳動法によって検定した。簡単に説明すると、同じタンパク質含有物を含む細胞培養の上澄から分離した培養上清を 3 倍のバッファーと混合して、1 mg/ml のゼラチンを含有する 10% w/v ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルを 100 ml の再生バッファー (2.5% Triton X-100 脱イオン水溶液) 中で攪拌しながらインキュベートした。次に、そのゲルを 100 ml の development バッファー (0.15 M の NaCl、50 mM の Tris-HCl、10 mM の CaCl<sub>2</sub>、0.05% の NaN<sub>3</sub>) 中で、37℃で一晩インキュベートした。ゲルは、0.5% Coomassie Blue R-250 40% メタノール/10% 酢酸溶液で、室温で 1 時間染色
- 10     した。続いて 4 時間、時々脱色液 (40% メタノール/10% 酢酸 脱イオン水溶液) を換えながら脱色を行った。蛋白質分解活性のバンドは、紺青色のバックグラウンドに対してクリアバンドとして明らかに見られた。ポジティブコントロールとして、ヒト繊維肉腫細胞株 HT1080 の培地を用いた。

- 図 4 に示すように、正常酸素状態で分化した未成熟樹状細胞及び成熟樹状細胞
- 20     は、低酸素状態で分化したものよりも高いレベルで MMP-9 タンパク質を分泌した。MMP-9 の活性形態は、正常酸素状態で分化した樹状細胞にのみ検出された。次いで、正常酸素状態及び低酸素状態で分化した未成熟樹状細胞及び成熟樹状細胞から分泌された MMP-9 のタンパク質の分解活性を調べた。図 5 に示すように、ゼラチンザイモグラフィは、低酸素状態で分化した樹状細胞よりも正常酸素
- 25     状態で分化した樹状細胞の方がより高いレベルで pro-MMP-9 を分泌したことを示している。MMP-9 タンパク質の活性形態は、正常酸素状態で分化した樹状細胞にのみ分泌された。これらの結果は、低酸素状態で分化した樹状細胞が正常酸素状態で分化した樹状細胞よりもタンパク質分解活性が低いことを示している。

### 実施例 6

実施例 1 で得られた未成熟樹状細胞及び成熟樹状細胞を、低酸素状態及び正常酸素状態で分化し、それぞれの細胞中の MMP-9 の特異的阻害剤である、TIMP-1、TIMP-2 及び TIMP-3 の発現をリアルタイム PCR 法により調べた。

- 5 方法は実施例 3 と同様に行った。TIMP-1 のプライマーとしては配列番号 3 及び配列番号 4 に示すものを、TIMP-2 のプライマーとしては配列番号 5 及び配列番号 6 に示すものを、TIMP-3 のプライマーとしては配列番号 7 及び配列番号 8 に示すものを用いた。

- 結果を図 6 に示す。図 6 は、リアルタイム PCR の結果を示す図である。図 6 に示すように、TIMP-1 は低酸素状態で分化した樹状細胞において、正常酸素状態で分化した樹状細胞よりも高いレベルで発現した。TIMP-2 及び TIMP-3 は、正常酸素状態及び低酸素状態の両方で培養された樹状細胞において同レベルで発現した。TIMP-1 は、MMP-9 の特異的阻害剤であるから、この結果は、低酸素状態で分化した樹状細胞が正常酸素状態で分化した樹状細胞よりも低いタンパク質分解活性を有することを示す。
- 10  
15

### 実施例 7

- Transwell Chamber 法を用いて上室と下室をくぎるメンブレン上にマトリゲルを固相化し、洗浄後、上室に樹状細胞を入れ、下室には未成熟樹状細胞の場合にはリコンビナントヒト RANTES を 100 ng/ml 入れ、成熟樹状細胞の場合にはリコンビナントヒト MCP-3 を 100 ng/ml 入れ、下室に移動してきた細胞数を計測し、樹状細胞の浸潤能の活性を測定した。
- 20

- 結果を図 7 に示す。図 7 は未成熟樹状細胞及び成熟樹状細胞の浸潤能の活性を測定した結果を示すグラフである。図 7 に示すように、未成熟樹状細胞及び成熟細胞は、いずれも正常酸素状態で分化した方が、低酸素状態で分化したものよりも高い浸潤能の活性を有していた。
- 25

### 実施例 8

TIMP-1 タンパク質による浸潤能活性の低下を調べるため、実施例 7 で行った系に TIMP-1 タンパク質を  $10 \text{ ng/ml}$  加えて同様に試験を行った。

結果を図 8 に示す。図 8 は、TIMP-1 タンパク質による樹状細胞の浸潤能活性の変化を調べた結果を示すグラフである。図 8 において、+ は TIMP-1 タンパク質を加えた場合の結果であり、- は TIMP-1 タンパク質を加えない場合の結果である。図 8 に示すように、正常酸素状態で分化した未成熟樹状細胞及び成熟樹状細胞の浸潤能活性は、TIMP-1 タンパク質によって低下することがわかる。これに対し、低酸素状態で分化した未成熟樹状細胞及び成熟樹状細胞の浸潤能活性は TIMP-1 タンパク質によって変化しなかった。

### 実施例 9

実施例 1 で得られた成熟樹状細胞を、全トランスレチノイン酸を培地に  $1 \mu\text{M}$  濃度になるように添加し、3 日間培養するか、全トランスレチノイン酸を培地に  $5 \mu\text{M}$  濃度になるように添加して 1 日培養し、次いで全トランスレチノイン酸を培地に  $1 \mu\text{M}$  濃度に添加して 2 日培養して、樹状細胞の分化を行った。分化誘導後、細胞中の MMP-9 の mRNA 濃度を測定した。結果を図 9 に示す。図 9 に示すように、MMP-9 の mRNA 濃度は、培地中に全トランスレチノイン酸を添加することにより上昇した。

20

### 実施例 10

実施例 1 で得られた成熟樹状細胞を、全トランスレチノイン酸を培地に  $1 \mu\text{M}$  濃度になるように添加して培養を行い分化誘導を行った。次いで、実施例 7 と同様に操作を行い、樹状細胞の浸潤能の活性を測定した。結果を図 10 に示す。図 10 は、低酸素下で分化した樹状細胞の浸潤能活性を測定した結果である。図 10 に示すように、樹状細胞の浸潤能は培地中に全トランスレチノイン酸を添加することにより向上した。

以上詳述した通り、レチノイドである全トランスレチノイン酸は、樹状細胞が浸

潤能を発揮するために必要なMMP-9の産生を増大し、それにより樹状細胞の浸潤能を活性化することが見出された。この効果は、低酸素状態においても発揮され、酸素濃度が低下している癌細胞においても発揮される。従って、本発明の樹状細胞浸潤能活性化組成物は免疫賦活化作用を発揮し、哺乳動物の免疫を賦活化するため

5 にも用いられる。また、本発明の樹状細胞浸潤能活性化組成物及び免疫賦活剤は、動物の感染症、癌の予防・治療に用いることができる。

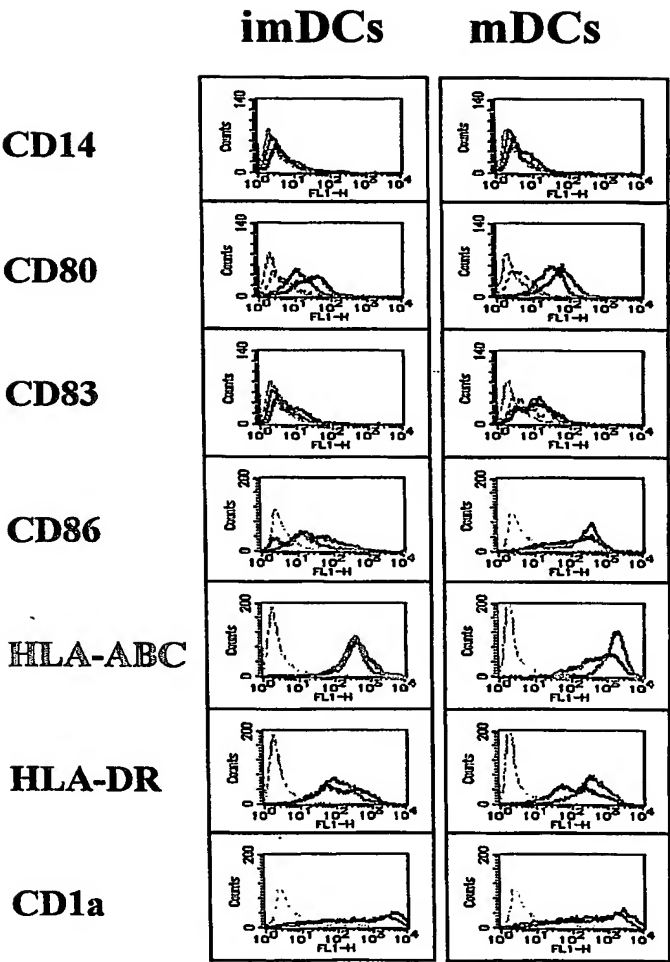


## 請求の範囲

1. レチノイドを含有する、樹状細胞浸潤能活性化組成物。
2. レチノイドが、全トランスレチノール、13-シスレチノール、全トランス
- 5 レチノイン酸及び13-シスレチノイン酸からなる群より選択される、請求項1に記載の樹状細胞浸潤能活性化組成物。
3. 哺乳動物に対して、レチノイドを投与することを特徴とする、樹状細胞の浸潤能を活性化する方法。
4. レチノイドが、全トランスレチノール、13-シスレチノール、全トランス
- 10 レチノイン酸及び13-シスレチノイン酸からなる群より選択される、請求項3に記載の樹状細胞の浸潤能を活性化する方法。
5. 哺乳動物に対して、請求項1又は2に記載の樹状細胞浸潤能活性化組成物を投与することを特徴とする、樹状細胞の浸潤能を活性化する方法。
6. レチノイドを含有する、免疫賦活剤。
- 15 7. レチノイド及び樹状細胞を含有する、免疫賦活剤。
8. レチノイドが、全トランスレチノール、13-シスレチノール、全トランスレチノイン酸及び13-シスレチノイン酸からなる群より選択される、請求項6又は7に記載の免疫賦活剤。
9. 哺乳動物細胞に対して、レチノイドを投与することを特徴とする、哺乳動物
- 20 の免疫を賦活化する方法。
10. 哺乳動物に対して、請求項6～8のいずれか1項に記載の免疫賦活剤を投与することを特徴とする、哺乳動物の免疫を賦活化する方法。
11. レチノイドが、全トランスレチノール、13-シスレチノール、全トランスレチノイン酸及び13-シスレチノイン酸からなる群より選択される、請求項10
- 25 に記載の哺乳動物の免疫を賦活化する方法。
12. 請求項1又は2に記載の樹状細胞浸潤能活性化組成物、又は請求項6～8のいずれか1項に記載の免疫賦活剤を、投与又は使用することを特徴とする、動物の感染症、癌の予防・治療方法。

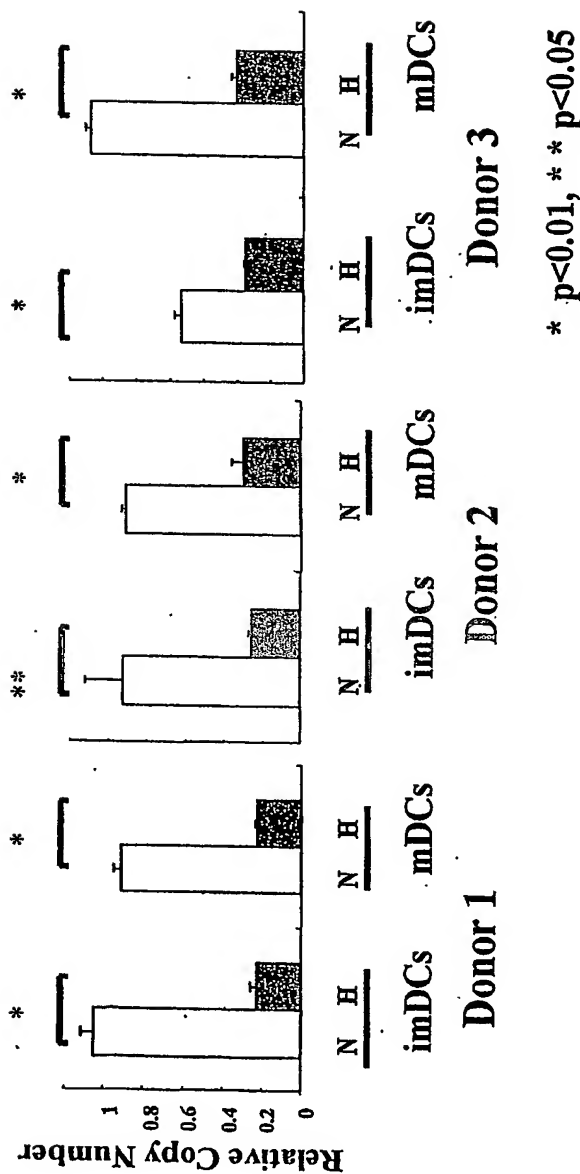
1 / 1 0

図 1



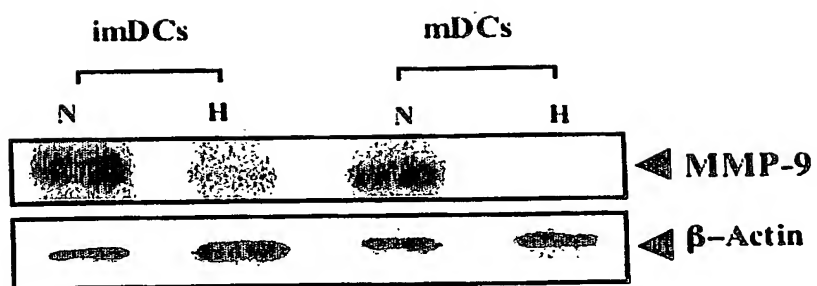
2 / 1 0

図 2



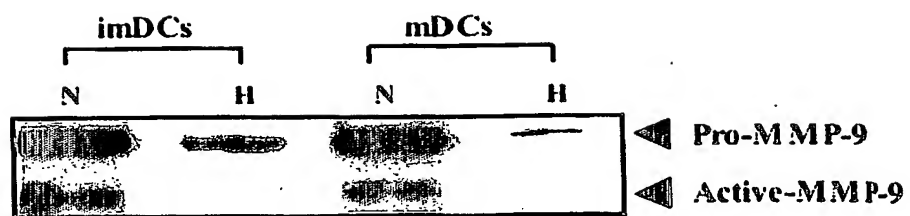
3 / 1 0

図 3



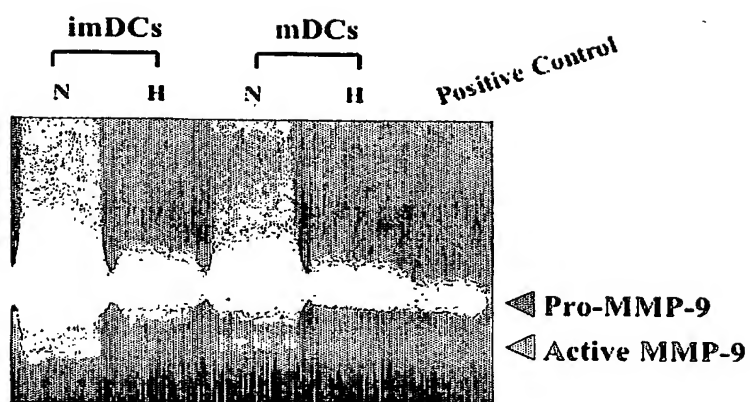
4 / 10

図 4



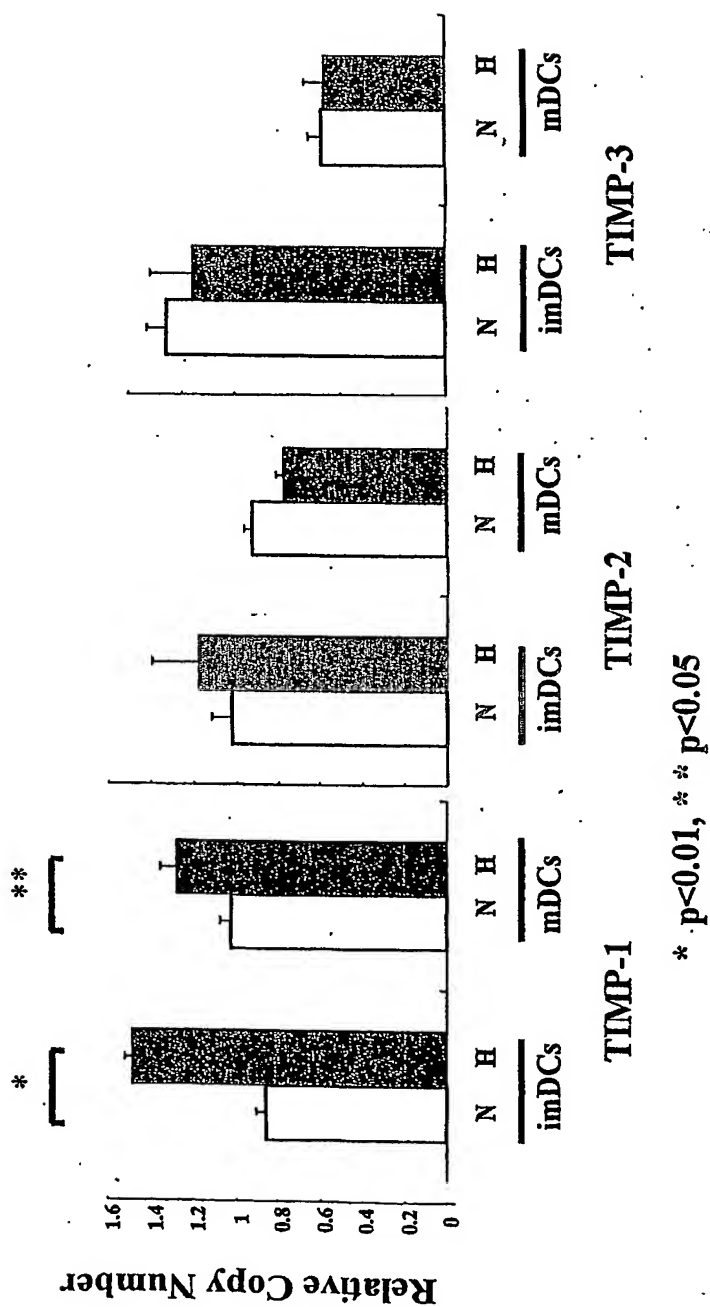
5 / 1 0

図 5



6 / 10

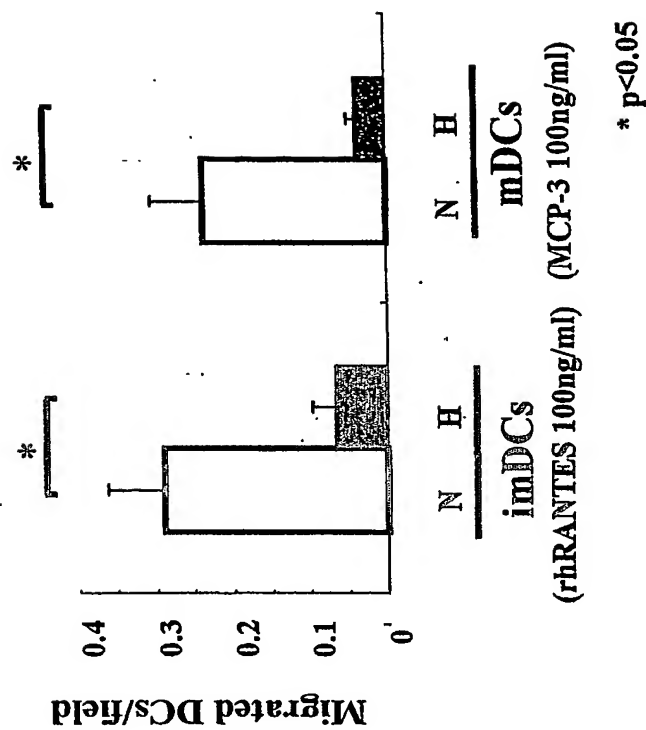
図 6



\*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$

7 / 1 0

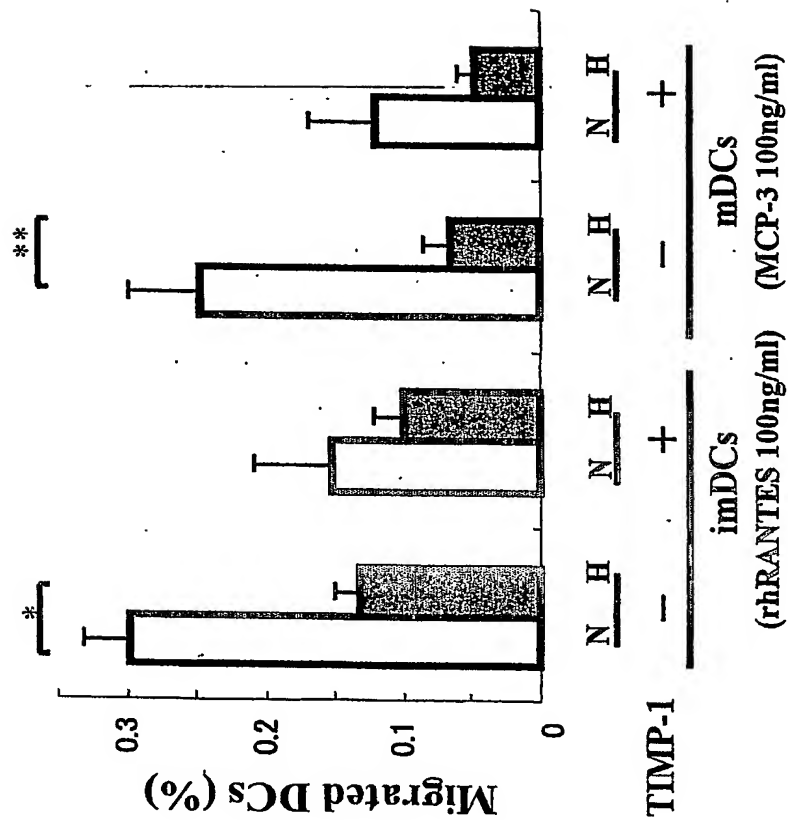
図 7





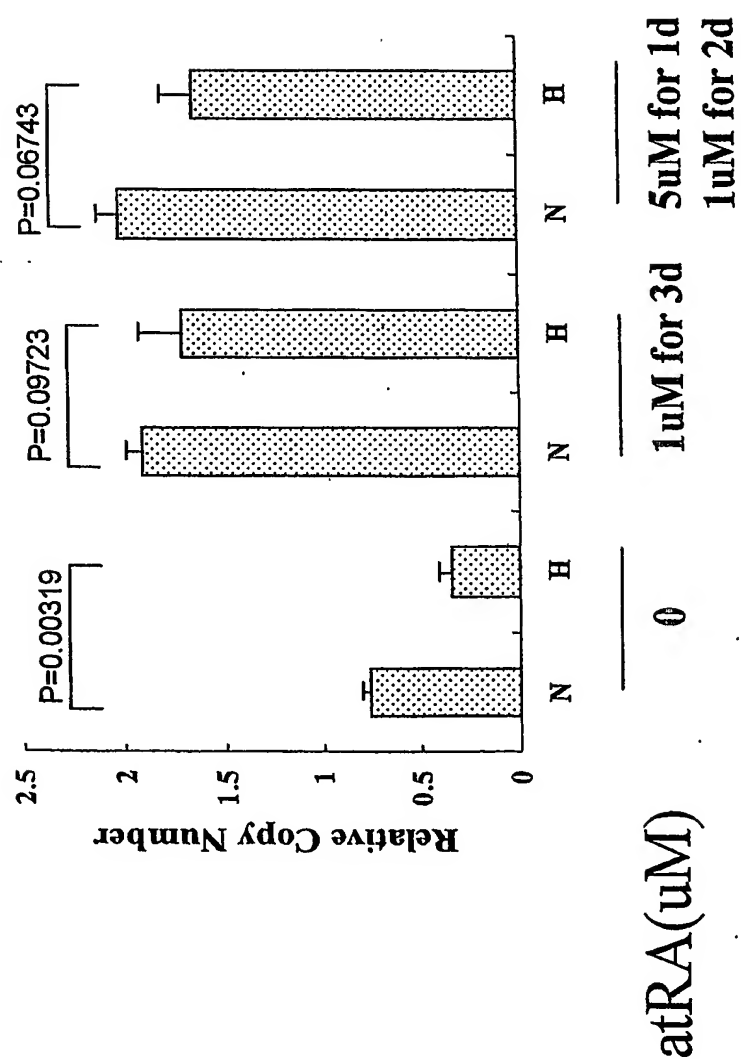
8 / 1 0

図 8



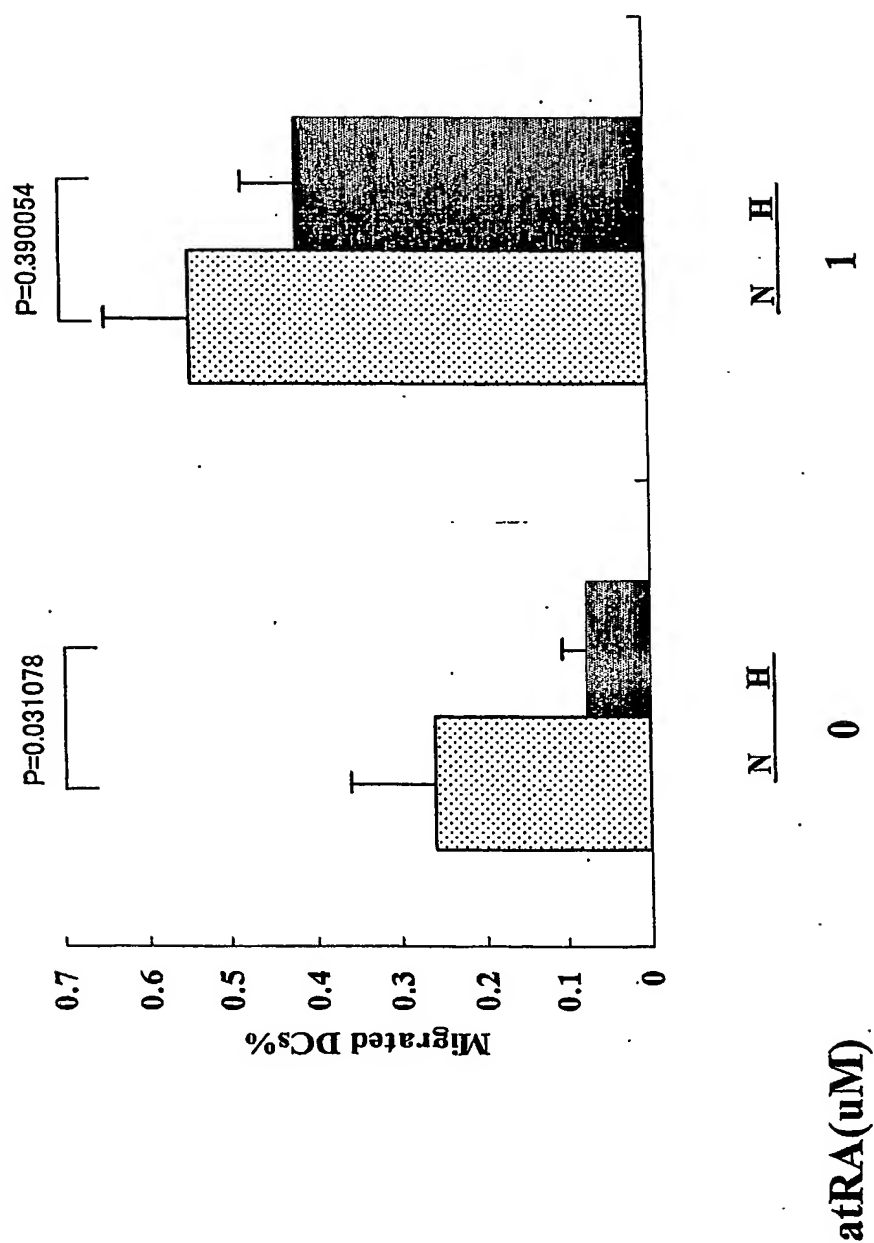
9 / 10

図 9



10/10

図 10



## SEQUENCE LISTING

<110> HOKKAIDO TECHNOLOGY LICENSING OFFICE CO., LTD.

5 <120> immunostimulator

<130> pctf158

<140>

10 <141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 1

25 cctttgaggg cgacctcaag

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 <220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 2

ctggatgacg atgtctgcgt

20

10

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

20 <400> 3

acagacggcc ttctgcaatt c

21

<210> 4

25 <211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 4

5 ggtgtagacg aaccggatgt ca

22

<210> 5

<211> 21

10 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

15

<400> 5

gttcaaaggg cctgagaagg a

21

20 <210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25 <220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCT primer

<400> 6

ccagggcacg atgaagta

19

<210> 7

5 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10 <223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 7

gccttctgca actccgacat

20

15

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 8

25 tctcggaagc ticcgtatgg

20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08720

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K61/07, A61P31/00, 35/00, 37/04, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K61/07

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Chiriva-Internati, Maurizio; Grizzi, Fabio; Franceschini, Barbara; Hermonat Paul L.; Lim, Seah; Dioguardi, Nicola, Expression of surface CD40 and immunocytochemical actin-bundling protein fascin in dendritic cells from multiple myeloma treated with retinoids during their differentiation in vitro, In Vitro Cellular & Developmental Biology: Animal, (2001), 37(10), 641 to 643	1, 2, 6-8
X	JP 5-163160 A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 29 June, 1993 (29.06.93), Full text & EP 546870 A	1, 2, 6-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
07 August, 2003 (07.08.03)

Date of mailing of the international search report  
19 August, 2003 (19.08.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08720

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 6-192073 A (Eisai Co., Ltd.), 12 July, 1994 (12.07.94), Full text (Family: none)	1, 2, 6-8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08720

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 3-5, 9-12

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in claims 3 to 5, 9 to 12 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K61/07, A61P31/00, 35/00, 37/04, 43/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K61/07

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Chiriva-Internati, Maurizio; Grizzi, Fabio; Franceschini, Barbara; Hermonat, Paul L.; Lim, Seah; Dioguardi, Nicola, Expression of surface CD40 and immunocytochemical actin-bundling protein fascin in dendritic cells from multiple myeloma treated with retinoids during their differentiation in vitro, In Vitro Cellular & Developmental Biology: Animal (2001), 37(10), 641-643	1, 2, 6-8
X	J P 5-163160 A (雪印乳業株式会社) 1993. 06. 29, 文献全体 & E P 546870 A	1, 2, 6-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.08.03

国際調査報告の発送日

19.08.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内藤 伸一

4 P

8615

電話番号 03-3581-1101 内線 3492



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 6-192073 A (エーザイ株式会社.) 1994. 0 7. 12, 文献全体 (ファミリーなし)	1, 2, 6-8

## 第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 3-5, 9-12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 3-5, 9-12 の発明は、治療による人体の処置方法に関するものである。

2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

## 第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。